

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(51) 国際特許分類6 C07K 14/51, C12N 15/12, 5/10, C07K 16/18	A1	(11) 国際公開番号 WO98/43998
		(43) 国際公開日 1998年10月8日 (08.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01511		
(22) 国際出願日 1998年4月1日 (01.04.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/99653	1997年4月1日 (01.04.97) JP	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所(CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 木村直紀(KIMURA, Naoki)[JP/JP] 豊島知子(TOYOSHIMA, Tomoko)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		

(54) Title: NOVEL MEMBRANE-SECRETED PROTEIN

(54) 発明の名称 新規な膜分泌タンパク質

(57) Abstract

Three genes encoding membrane-secreted proteins have been successfully isolated from osteoblast-like cell lines by using a method for specifically cloning membrane-secreted proteins. As the result of subsequent analysis on one of these genes, it has been found out that the protein encoded by this gene is a novel receptor protein which has an extracellular region alone, binds to cell membranes via a GPI anchor and carries therein a cysteine-rich repetitive region conserved in the TNF receptor super family. It has been also found out that when this protein is largely expressed in an osteoblast-like cell line, the proliferation of the cells are suppressed, the cells are morphologically changed, and the alkaline phosphatase activity which is one of the indications of the differentiation of osteoblasts is elevated.

(57)要約

膜分泌タンパク質をコードする遺伝子を特異的にクローニングする方法を用いることにより、骨芽細胞様細胞株から3種類の膜分泌タンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。その中の1つの遺伝子について解析を進めたところ、該遺伝子がコードするタンパク質が、細胞外領域のみを有しGPIアンカーにより細胞膜に結合するタンパク質であり、その内部にTNF受容体スーパーファミリーに保存されているシステインに富む繰り返し領域を有する新規な受容体タンパク質であることを見出した。さらに、該タンパク質を骨芽細胞様細胞株で高発現させることにより細胞増殖が抑制されて細胞の形態が変化し、また骨芽細胞の分化の指標の一つであるアルカリ fosfataーゼ活性が増大することを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英國	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴー
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルコミニスタン
BF	ブルキナ・ファン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	共和国		TT	トリニダッド・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴースラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明細書

新規な膜分泌タンパク質

技術分野

本発明は骨細胞の分化に関する新規な膜分泌タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質を利用した化合物のスクリーニング方法、並びに該スクリーニング方法により単離しうる化合物に関する。

背景技術

骨芽細胞の働きで骨が再生する現象、即ち、骨形成は、脊椎動物の生体維持などに重要な現象である。骨形成に関する因子としては、これまでにホルモンではエストロゲン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン（PTH）が、増殖因子ではBMP（Bone Morphogenic Protein）が、その他薬剤では活性化ビタミンD、カルシウム製剤、ビタミンK2などが知られている。このうちエストロゲン、カルシトニン、活性化ビタミンD、カルシウム製剤などが現在骨粗しよう症などの骨量改善 治療薬として応用されているが、いずれも骨量を増加させるというよりは、骨吸収抑制を機序とした骨量減少の防止薬として使用されており、実効性のある骨形成促進薬はいまだ開発されていないのが現状である。

一方、骨関連疾患の新規治療薬として期待されているBMPは、異所性形成シグナルとしての作用を有する唯一のサイトカインである。BMPは、実際に骨折や骨欠損時の修復反応の際起こる、いわゆる軟骨性の仮骨から新生骨に置換されることによって起こる骨形成（軟骨内骨化）に有用であると考えられている（Duprez DM, Coltey M, Amthor H, Brickell PM, Tickle C(1996)Dev Biol 174 448-452 Bone morphogenetic protein-2(BMP-2)inhibits muscle development and promotes car

tilage formation in chick limb bud cultures、Nakase T,Nomura S,Yoshikawa H,Hashimoto J,Hirota S,Kitamura Y,Oikawa S,Ono K,Takaoka K(1994)J Bone Miner Res 9 651-659 Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing)。

しかしながら、恒常的骨形成の際の骨吸収と共に役して引き起こされる骨形成においては、BMPが関与することについての確証的な報告はない。従って、BMPも恒常的骨形成に必須とされる骨芽細胞の分化促進や活性化を利用した骨形成促進薬として利用できるとは言い難い。即ち、恒常的骨形成に関与する因子についてはこれまでに報告例がないのが現状である。

発明の開示

本発明は、恒常的骨形成に関与する新規なタンパク質およびその遺伝子を提供することを課題とする。また、本発明は、該遺伝子が挿入されたベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に結合する抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該タンパク質を利用した、リガンドなどの該タンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、膜分泌タンパク質をコードする遺伝子を特異的にクローニングする方法を用いることにより、骨芽細胞様細胞株から3種類の膜分泌タンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。本発明者らは、その中の1つの遺伝子について解析を進めたところ、該遺伝子がコードするタンパク質が、細胞外領域のみを有しGPIアンカーにより細胞膜に結合するタンパク質であり、その内部にTNF受容体スーパーファミリーに保存されているシステインに富む繰り返し領域を有する新規な受容体タンパク質であることを見出した。さらに、本発明者らは、該タンパク質を骨芽細胞様細胞株で高発現させることにより細胞増殖が抑制されて細胞の形態が変化し、また骨芽細胞の分化の指標の一つであるアルカリフォスファターゼ活性が増大することを

見出した。また、このように単離したタンパク質が骨細胞の分化に関与していることから、該タンパク質を利用して骨関連疾患に対する医薬品候補化合物をスクリーニングすることができることを見出した。

即ち、本発明は新規な膜分泌タンパク質およびその遺伝子、該タンパク質を利用した医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1または2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはこれらタンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、骨細胞の分化誘導活性を有するタンパク質、
- (2) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、骨細胞の分化誘導活性を有するタンパク質、
- (3) (1)または(2)に記載のタンパク質をコードするDNA、
- (4) (3)に記載のDNAが挿入されたベクター、
- (5) (4)に記載のベクターを保持する宿主細胞、
- (6) (1)または(2)に記載のタンパク質に結合する抗体、
- (7) (1)または(2)に記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) (1)または(2)に記載のタンパク質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) (1)または(2)に記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。
- (8) (1)または(2)に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) 細胞表面に発現させた(1)または(2)に記載のタンパク質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) (1)または(2)に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下において検出を行った場合と比較して、(1)または(2)に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する化合物を選択する工程、
を含む方法、

(9) (7)に記載の方法により単離しうる、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合する化合物、

(10) (8)に記載の方法により単離しうる、(1)または(2)に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する化合物、

(11) 天然由来である(9)または(10)に記載の化合物、

(12) リガンドである(9)または(10)に記載の化合物、

(13) アゴニストである(9)または(10)に記載の化合物、

(14) アンタゴニストである(9)または(10)に記載の化合物、

に関する。

本発明は、恒常的骨形成に関与すると考えられる新規な膜分泌タンパク質に関する。本発明者らにより単離されたマウス由来のcDNAの塩基配列を配列番号：3に、該cDNAによりコードされるタンパク質のうちシグナルペプチドを含むタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1に、N末端側のシグナルペプチドが除去された成熟タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。本発明者らは、単離したクローンを「7F4」と命名した。本発明のタンパク質に含まれる「7F4」タンパク質は、TNF受容体サブファミリーに保存されたシステインに富む領域を有し、そのN末端（シグナル配列領域）およびC末端に疎水性に富んだアミノ酸領域を有する。この「7F4」タンパク質は、データベース上において有意な相同性を示すアミノ酸配列を有するタンパク質は見出されなかった。従って、「7F4」タンパク質は、TNF受容体スーパーファミリー (Beutler.B, and Huffel.C.V(1994)SCIENCE 264, 667-668 Unraveling function in the TNF ligand and receptor families) に属する新規なタンパク質であると考えられる（図6参照）。

「7F4」タンパク質を高発現させたKUSA細胞（該細胞は正常マウス骨髓間質由來の細胞であり、造血指示能を有する他、*in vivo*での移植により骨髓を誘導しつつ骨形成を引き起こすことが知られている。文献「Umezawa,A., Maruyama,T., Segawa,K., Shadduck,R.K., Waheed,A., and Hata,J.(1992) Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. J.Cell.Physiol.151, 197-205」参照）の形質転換体をPI特異的ホスホリバーゼC (PI-specific phospholipase C) で処理すると、該タンパク質の細胞表面における存在量が低下した（実施例7）。このため「7F4」タンパク質には細胞内領域は存在せず、GPIアンカーを介して細胞表面に固定される構造を有していると考えられる。GPIアンカーモデルタンパク質としては、CNTF受容体などが知られている。また、IL-6、IL-11受容体の細胞内領域は非常に短く、リガンド結合後のシグナル伝達に関わる領域を有していない。これら受容体は共にリガンドが結合するとgp130と会合し、gp130をシグナル伝達鎖として利用して、シグナルを細胞内へ伝達する。「7F4」もまた、多くのサイトカインレセプターと同様、gp130のようなシグナル伝達鎖と会合する機構によりシグナルを核へと伝達しているのかもしれない。実際に、KUSA細胞において「7F4」タンパク質を過剰発現させると、その発現量に相関して細胞形態が変化し、細胞の増殖速度が低下する傾向を示し（実施例6）、骨芽細胞の分化の指標の一つであるアルカリリフォスマターゼ活性が増大した（実施例8）。これら事実から、「7F4」タンパク質は、特に、骨細胞の分化シグナルに関与していると考えられる。従って、「7F4」タンパク質やこれに結合する化合物には、後述するように、特に骨関連疾患の予防や治療への利用が考えられる。また、骨細胞分化マーカーとしての診断への応用も考えられる。

骨芽細胞を長期に渡り培養し続けると骨形成マーカーの発現が上昇し、自ら分化に至ることが報告されている（Matsumoto T, Igarashi C, Takeuchi Y, Harada S, Kikuchi T, Yamato H, and Ogata E.(1991) Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of *in vitro* mineralization induced by osteoblast-like MC3T3

-E1 cells. Bone. 12, 27-32、Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, and Kasai S.(1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. J Cell Biol .96, 191-198)。骨組織を誘導する唯一の骨形成因子であり、軟骨形成を経てから骨形成を引き起こす因子としてBMPが知られているが、骨芽細胞、特にKUSA細胞における骨形成においては軟骨細胞の出現は観察されない。従って、この骨分化機構は、BMP (Wozney, JM, Rosen, V, Celeste, AJ, Mitsock, LM, Whitters, MJ, Kriz, RW, Hewick, RM, and Wang, EA(1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.Science. 242, 1528-1534) の作用からは説明がつかず、現在、未知の骨形成因子の存在が有力視されている。「7F4」タンパク質は、この骨形成因子の有力な候補である。

また、本発明は、「7F4」タンパク質と機能的に同等なタンパク質に関する。「7F4」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel, TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492)などを用いて、「7F4」タンパク質（配列番号：1または

2) 中のアミノ酸に適宜変異を導入することにより「7F4」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、「7F4」タンパク質のアミノ酸配列において1もししくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、「7F4」タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。機能的観点から、変異するアミノ酸は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは、15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。

また、機能的に同等なタンパク質を単離する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook,J et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用した方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、「7F4」タンパク質をコードするDNA配列(配列番号：3)もししくはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから「7F4」タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうことである。このように、「7F4」タンパク質をコードするDNA配列もししくはその一部からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、「7F4」タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、マウス以外の哺乳動物のホモログ(例えば、実施例3のノーザンプロッティングにより検出されたヒト遺伝子がコードするタンパク質)が挙げられる。ハイブリダイズ技術により得られるタンパク質は、通常、「7F4」タンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸配列において、通常、40%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、さらに好ましくは80%以上の相同性である。

本発明において「7F4」タンパク質と「機能的に同等」とは、タンパク質が「7F4」タンパク質と同様に骨細胞の分化を誘導する活性を有することを指す。骨細胞の分化を誘導する活性とは、骨細胞の細胞増殖速度の低下をもたらし、該細胞

の形態を変化させる活性を指す。該活性は、例えば、顕微鏡による骨細胞の形態学的観察や、骨細胞の分化マーカーとして一般に用いられているアルカリフオスファターゼの活性測定などの方法 (N.C.Partrige,D.Alcorn,V.P.Michelangeli,G.Ryan & T.J.Martin(1983) Cancer Res 43 4308-14.Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin, J.K.Burns & W.A.Peck(1978) Science 199 542-4.Bone cells:a serum-free medium supports proliferation in primary culture) により検出することが可能である。アルカリフオスファターゼの活性の測定は、例えば、細胞を超音波破碎により破壊し、細胞抽出液を得て、これをアルカリフオスファターゼの基質であるp-ニトロフェニルfosfate (p-nitrophenyl phosphate) とインキュベートしたのち、分解されて産生したp-ニトロフェノール (p-nitrophenol) の量を分光光度計により定量するなどの方法で行うことが可能である。また、オステオカルシン (osteocalcine) やコラーゲンタイプIを指標に検出することも可能である。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、例えば、本発明のタンパク質の膜結合に必要な領域以外の部分を細胞内で発現させ、細胞に分泌させる。次いで、この細胞の培養上清を回収し、濃縮した後、イオン交換、逆相、ゲルfiltrationなどのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティーコロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製することが可能である。また、本発明のタンパク質をグルタチオンSトランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させ、発現させた組み換えタンパク質をグルタチオンカラム、あるいはニッケルカラムにより精製する。その後、必要に応じて融合タンパク質

のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去する方法により調製できる。天然のタンパク質であれば、例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞の抽出物に対し、後述する本発明の抗体が結合したアフィニティーカラムを作用させて精製することにより単離することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるなどを問わない。本発明のDNAは、例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：3に記載のDNA配列）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。また、本発明のタンパク質を発現している細胞よりRNAを調製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：3に記載のDNA配列）に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。本発明のDNAは、本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として生産するために利用することができる。また、本発明のタンパク質をコードするDNAに欠陥がある場合には、アンチセンスによる機能阻害や、正常な遺伝子に置き換える遺伝子治療などへの応用も考えられる。

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、例えば、宿主を大腸菌とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、

pCR-Scriptなどが挙げられる。またcDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合も上記ベクターの他に、pGEM-T、pDIRECT、pT7などがあげられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター（例えば、lac, T7など）を持っていことが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21)などが挙げられる。

また、CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター（SV40, MMLV-LTR, EF1 α , CMVプロモーターなど）を持っていることが不可欠であり、さらに細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

さらに、細胞内でのコピー数の増幅を目的とした宿主ベクター系においては、安定産生細胞株の場合は、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を用いメトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製機転を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込みレトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。

用いられるベクターに特に制限はないが、pAdexlcwやpZIPneoなどが好適である。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning ,5.61-5.63）。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。大腸菌では、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、動物細胞においては、例えば、CHO細胞、COS細胞、3T3細胞、HeLa細胞などが挙げられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。

一方、生体内で本発明のDNAを発現させるために用いられる細胞としては、特に制限はなく、種々の動物細胞が挙げられるが、骨関連疾患の遺伝子治療を行う場合には、特に、体内より採取した間葉系細胞、骨芽細胞などの細胞が標的細胞として好適である。

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション、リボフェクションなどの方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質と結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどに本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。本発明の抗体は、以下の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムにより、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分から免疫グロブリンGあるいはMを、プロテインA、あるいはプロテインGカラムにより精製することにより調製すること

ができる。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、骨関連疾患の抗体治療への応用も考えられる。抗体治療に用いる場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法、並びに該スクリーニング方法により単離しうる化合物（例えば、リガンド、アゴニスト、およびアンタゴニスト）に関する。

このスクリーニング方法の一つの態様は、(a) 本発明のタンパク質に被検試料を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。このスクリーニング方法に用いられる被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、タンパク質、ペプチド、合成低分子化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、また、細胞膜画分として、被検試料に接触させることができる。被検試料の本発明のタンパク質に対する結合活性は、例えば、後述する当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。

また、他の一つの態様は、(a) 細胞表面に発現させた本発明のタンパク質に被検試料を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性

を検出する工程、(c) 被検試料非存在下において検出を行った場合と比較して、本発明のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む。本発明のタンパク質を発現させる細胞としては、本発明のタンパク質に結合するリガンドを発現していない細胞が好ましい。本発明のタンパク質の細胞表面への発現は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当なベクターに挿入し、これを細胞内に導入することにより行うことができる。本発明のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性は、例えば、顕微鏡による骨細胞の形態学的観察や、骨細胞の分化マーカーとして一般に用いられているアルカリリフォスファターゼの活性測定などの方法 (N.C.Partrige,D.Alcorn,V.P.Michelangeli, G.Ryan & T.J.Martin(1983) *Cancer Res* 43 4308-14. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin, J.K.Burns & W.A.Peck(1978) *Science* 199 542-4. Bone cells:a serum-free medium supports proliferation in primary culture) により検出することが可能である。アルカリリフォスファターゼの活性の測定は、例えば、細胞を超音波破碎により破壊し、細胞抽出液を得て、これをアルカリリフォスファターゼの基質であるp-ニトロフェニルfosfate (p-nitrophenyl phosphate) とインキュベートしたのち、分解されて產生したp-ニトロフェノール (p-nitrophenol) の量を分光光度計により定量するなどの方法で行うことが可能である。また、オステオカルシン (Osteocalcine) やコラーゲンタイプIを指標に検出することも可能である。

具体的な方法としては、例えば、以下の方法を用いることができる。本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に対するリガンドを単離する方法としては、例えば、リガンドを発現することが予想される細胞（例えば、KUSA細胞、ROS17/2.8細胞、UMR106-01細胞、UMR106-06細胞、MC3T3E1細胞、HOS-TE85細胞、MG63細胞、SaOS2細胞、UMR206細胞、RCT1細胞、C3H10T1/2細胞などの骨芽細胞株、OP9細胞、Sトローマ細胞、NIH3T3細胞などの繊維芽細胞など）よりファージベクタ

ー (λgt11, ZAPなど) を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、本発明のタンパク質をビオチンラベル、あるいはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、結合するタンパク質を発現しているブラークを、ストレプトアビシン、あるいは抗GST抗体により検出する「ウエストウエスタンプロッティング法」 (Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, and Schlessinger J (1991)Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. Cell 65, 83-90) により調製することが可能である。また、本発明のタンパク質をSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、リガンドを発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローニングからライブラリー由来cDNAを単離して大腸菌に導入して発現させる（酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローニングが確認できる）「twoハイブリッドシステム」（「MATCHMARKER Two-Hybrid System」、「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」、「MATCHMAKER One-Hybrid System」（いずれもclontech社製）、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene社製)、文献「Dalton S, and Treisman R (1992)Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」）に従い調製することも可能である。さらに、本発明のタンパク質をそのリガンドを発現していない細胞で発現させ、次いで、該細胞に、リガンドを発現することが予想される細胞より構築した発現cDNAライブラリーをCOSなどの細胞に導入して得た培養上清を添加し、そして細胞のある種の変化（増殖速度、形態、アルカリリフォスファターゼの発現など）を指標にリガンドを探索する。

「ダイレクト発現クローニング法」 (Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, De Vries JE, Lee F, and Arai K.(1986) Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. Proc Natl Acad Sci U S A. 83, 5894-5898) により調製することも可能である。さらにまた、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムに本発明のリガンドを発現していることが予想される細胞の培養上清をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより調製することも可能である。なお、得られたタンパク質（リガンド）のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該リガンドをコードするDNAを得ることも可能である。なお、本発明において、「リガンド」とは、細胞膜に発現する本発明のタンパク質に結合することにより、その機能を活性化するタンパク質を指す。

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に対するアゴニスト、およびアンタゴニストを単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、化合物、または天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作成させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64、Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13、Hogan JC Jr., Direct ed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) により本発明のタンパク質に対するアゴニストやアンタゴニストを単離する方法が当業者に周知の技術である。なお、本発明において「アゴニスト」とは、本発明の

タンパク質とリガンドとの結合と同様の現象（本発明のタンパク質の活性化）を引き起こすことができる、本発明のタンパク質に特異的に結合できる分子を指す。また、「アンタゴニスト」とは、本発明のタンパク質に特異的に結合することによってその機能を抑制する分子を指す。

これにより単離されたリガンド、アゴニスト、アンタゴニストには、以下のようないくつかの応用が考えられる。例えば、リガンド、アゴニスト、もしくはアンタゴニストの投与により、骨芽細胞の分化誘導、活性化を導き、加齢とともに生じる骨粗鬆症、変形性関節症における骨量の改善や骨形成の促進、あるいは骨腫瘍に対する骨細胞分化の制御機能を利用した抗癌治療を行うことが考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、クローニングTF4のオープンレーディングフレームを含むcDNA配列とそのアミノ酸配列を示す図である。上段に塩基配列を、下段にアミノ酸配列を記した。下線は二つの疎水性領域を示したもので、N末側がシグナル配列、C末側がGPIリンカーとの置換領域と推測される。

図2は、TF4とマウスTNFRの細胞外領域でのアミノ酸配列の比較を示す図である。上段がTF4、下段がマウスTNFRの細胞外領域のアミノ酸配列である。一致するシステインを白抜きで、それ以外の一致するアミノ酸をラインで示した。

図3は、種々のマウス組織でのTF4遺伝子の発現をノーザンプロット解析した電気泳動像である。

図4は、種々のヒト組織でのTF4遺伝子の発現をノーザンプロット解析した電気泳動像である。

図5は、図5Aは、TF4タンパク質の疎水性を示す図である。図の横軸の左側がTF4タンパク質のN末端側を、右側がC末端側を示す。また、図の縦軸は疎水性の度合いを示す。図5Bは、KUSA細胞の表面上のTF4タンパク質、およびTF4を過剰発現させた2種のクローニングにおけるPI特異的ホスホリバーゼC処理後の細胞表面上の7

F4タンパク質を検出した図である。図の点線は未処理の細胞における結果、実線は処理した細胞における結果を示す。なお、図の縦軸は細胞数を示し、横軸は細胞の蛍光強度を示す。

図6は、TNF受容体スーパーファミリーに属する分子の構造を示す図である。システインに富む繰り返し配列を楕円で示した。なお、楕円中の横線はシステインの位置を示す。

図7は、7F4遺伝子の高発現によるKUSA細胞の増殖阻害を示す図である。7F4遺伝子を高発現させたKUSA細胞の増殖速度を経的に細胞数を計測して調べた。

図8は、7F4遺伝子の発現によるアルカリフォスファターゼ活性の変化を検出した結果を示す図である。KUSA細胞に7F4遺伝子を高発現させた各形質転換体から細胞がコンフルエントになる前に細胞溶解物を調製し、細胞内アルカリフォスファターゼ活性を測定した。

図9は、CHO細胞および7F4遺伝子が導入された形質転換体における7F4遺伝子の発現を検出した結果を示す図である。CHO細胞に7F4発現ベクターを形質転換して得た各クローンを7F4抗血清で染色し、ELITEでその発現量を解析した。

図10は、7F4遺伝子の高発現によるCOS細胞の増殖速度の変化を検出した結果を示す図である。7F4遺伝子を高発現させたCOS細胞の増殖速度を経的に細胞数を計測して調べた。

発明を実施する最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] 7F4遺伝子のクローニング

マウス骨芽細胞KUSAの発現する分泌、膜タンパク質をコードする遺伝子のクローニングは、「signal sequence trap」(SST)法に基本的に従って行った。具体的には、まずライブラリーの発現用ベクターとして用いる「pSR α Tac」を以下

の手順で構築した。ヒトの全長IL-2受容体遺伝子が挿入されたプラスミド、「pK CR.Tac-2A」（理研ジーンバンクより購入）をEcoRI、Eco47IIIで切り出し、Tac 全長をコードする遺伝子断片を得た。一方、動物細胞用発現ベクター「pcD-SR α -FE」（Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M, Arai N. Mol Cell Biol 8:466-472(1988) SR alpha promoter:an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat）が本来有しているSacI部位をなくしたのち、EcoRIで切断した。そして、これに上記のTacの全長をコードする遺伝子断片を挿入し「pSR α Tac」を構築した（このプラスミドはEcoRI、SacI切断することによりTacのシグナル配列の領域を除去することが可能となっている）。「5' enriched cDNA library」を作製するため、まずKUSA細胞から調製したmRNA 5μgをランダムプライマーを用いて第一鎖cDNAを合成した。その5'末端に、「terminal nucleotidyl transferase」でdCテーリングした後、EcoRI部位をもつプライマー「5'-GCGGCCGC GAATTCTGACTAACTGAC-(dG)17（配列番号：4）」を用いて、Taq DNAポリメラーゼにより第二鎖合成を行った。これを超音波破碎して適当な長さの断片にし、その末端を平滑化した後、SacIリンカー（5'末端側に「CCGCGAGCTCGATATCAAGCTTGAC（配列番号：5）」、3'末端側に「GGCGCTCGAGCTATAGTTGAACATGGAG（配列番号：6）」）を両端に挿入した。これを鋳型にして2つのプライマー（「5'-GAGGT ACAAGCTTGATATCGAGCTCGCGG-3'（配列番号：7）」、「5'-GCCGCGAATTCTGACTAACT GAC-3'（配列番号：8）」）によりPCRを行いcDNA断片を増幅させた。そして、1.5%アガロース電気泳動を行いおよそ400bpの断片をゲルから切り出した後、EcoRI、SacIで切断した。これを、上記方法で作製した発現ベクター「pSR α -TAC II」の EcoRI、SacI間に挿入した。次いで、このcDNAライブラリーを大腸菌JM109にトランسفォームし、49個の独立したクローンを1プールとして、いくつかの プールを作製した。各プールよりプラスミドを調製して、COS-7細胞にリポフェクトア

ミンを用いて導入した。2日後に細胞を0.05% EDTA/PBSではがし、1次抗体としてマウス抗IL-2受容体(Tac)IgG抗体を、二次抗体としてFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体を用いて細胞表面を染色し、Tacタンパク質を細胞表面に発現している細胞をフローサイトメーター(ELITE)を用いてスクリーニングした。Tac陽性のプールについてはさらにそれを分割して、単一のクローンが得られるまで上記ステップを繰り返し行った。この結果、シグナル配列を有する新規遺伝子を3クローン得た。一つは、基底膜タンパク質を構成するタンパク質の一つエンタクチン(entactin)にホモロジーの高い新規遺伝子(Entactin2)であり、他の一つは膜を5回ないし7回貫通するタイプの膜タンパク質であり、さらに他の一つはTNF受容体スーパーファミリーに保存されたシステイン繰り返しモチーフを有する新規遺伝子(このクローンを以下、「7F4」と称する)であった。クローン7F4には約400bpの断片しか含まれていなかった。

[実施例2] 全長cDNAのクローニングと塩基配列決定

より長い断片を単離するためため、この断片をプローブに再度KUSA細胞のcDNAライブラリーからブラークハイブリダイゼーションにより7F4遺伝子のクローニングを行った。まず、「oligo dT priming」の「KUSA cDNAライブラリー」をKUSA細胞より抽出したmRNAから、「ZAP-cDNA Synthesis Kit」(stratagene社製)を用い添付のプロトコールに従って作製した。この「KUSA cDNAライブラリー」50万クローン分のファージをプレートに広げ、SST法で得られた7F4のcDNA断片の一部を $\alpha^{32}P$ dCTPでラベルしこれをプローブにしてブラークハイブリダイゼーションを行った。ライブラリーを固定したフィルターをハイブリダイゼーション緩衝液(50% ホルムアミド, 5X SSPE, 5X デンハルト溶液, 0.1% SDS, 0.1mg/ml ニシン精子DNA)にて42°Cで6時間ほどインキュベートした後、プローブを含む同バッファーに換え、42°Cでさらに一晩インキュベートした。その後、2X SSC-0.1% SDSで数回洗浄後、0.1X SSC-0.1% SDSで60°Cで30分程度2回洗浄し、オートラジオグラフィーで検出した。陽性クローンから、これを「ExAssist helper phage

」(stratagene社製)を用いてプラスミドpBluescriptIIへ切り出しを行った。得られたプラスミドには開始コドンを含む約3kbのcDNA断片が含まれていた。このcDNAの塩基配列はプライマーウォーキング(primer walking)によりダイターミネーション(dyetermination)法(ABI PRISM sequencing kitによる)を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列から推定したアミノ酸配列を基にホモロジー検索を行ったところ一致する遺伝子は見出されず、7F4がコードする遺伝子が新規なものであることが判明した(図1)。興味深いことに、クローン7F4は膜で発現するのに必要なシグナル配列に続いて、TNF受容体スーパーファミリーに共通に保存されているシステインに富む繰り返しモチーフを3つ有しており、7F4がTNF受容体スーパーファミリーに属する新規膜タンパク質であることが判明した(図2)。

[実施例3] ノーザンプロットティング

マウスに対しては「Mouse multiple northern (MTN) blot」(CLONTECH社製)を、ヒトに対しては「human MTN blot」(CLONTECH社製)をフィルターに用いた。7F4 cDNAのORFを含む領域(塩基番号120-480)を「multiprime labelling」により $\alpha^{32}P$ で標識しこれをプローブにハイブリダイゼーションを行った。マウスに対しては「ExpressHyb Hybridization sol'n」(CLONETECH社製)で68°Cで2時間ほどインキュベートし、2X SSC-0.1% SDSで数回、0.1X SSC-0.1% SDSで60°Cで2回ほど洗浄した。ヒトに対しては、「ExpressHyb Hybridization sol'n」(CLONTECH社製)で68°Cで4時間ほどインキュベートし、2X SSC-0.05% SDSで42°C、10分で2回洗浄した。その後、「BAS2000」(FUJI社製)で検出した。この結果、マウスでは、どの組織でも偏在的な発現が認められた(図3)。一方、ヒトでも偏在的な発現が認められるが、その中でも骨格筋と心臓では特に発現が高く、この点が特徴的であった(図4)。また、マウス、ヒトとも約5kbの位置にバンドが検出され、この遺伝子のmRNAのサイズが約5kbであることが分かった。

[実施例4] GST融合タンパク質の発現と精製

7F4 cDNAのORFを含むプラスミド「pBluescript-7F4」を鋳型に配列番号：9および配列番号：10に記載した2つのプライマーで、PCRを行い7F4遺伝子の細胞外領域をコードする遺伝子を増幅させた。これをBamHI-EcoRIで切断し、「pGEX-2T」(pharmacia社製)のGST遺伝子の下流に挿入した。このプラスミドにより形質転換させたJM109を、0.5mM IPTG添加によりGST融合タンパク質を誘導させ3時間後に大腸菌を集菌し、1mg/ml リゾチーム(lysozyme)を含むソニケーション緩衝液(sonication buffer)(25mM Tris pH8.0, 10mM EDTA, 1mM PMSF)に懸濁した。氷中で30分放置した後これを超音波破碎し、次いで遠心し、上清を回収した。これを「Bulk GST purification Module」(pharmacia社製)の「Glutathione Sepharose4G Column」(pharmacia社製)にのせ、添付のプロトコールに従い目的のタンパク質を溶出し精製した。タンパク質は10% SDS PAGEを行いコマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した。また、抗GST抗体を用いたウェスタンプロティングにより確認した。

[実施例5] 抗血清の作製

精製した7F4-GST融合タンパク質を、PBSバッファーに置換した後、ウサギに免疫した。免疫は2週おきに行い一回目が600μg/head、二回目以降は200μg/headで行い、3回終了した時点で少量採血しELISAを行って力価を評価した。その結果十分抗体価が上昇していることが判明したため、その後最終免疫を行い、心採血により全採血を行った。

[実施例6] 7F4遺伝子発現細胞株の樹立

7F4の全ORFを含む遺伝子を配列番号：11および配列番号：12に記載の二つのプライマーによりPCRで増幅させ、これをEcoRI-BamHIで切断した。薬剤選択マーカーとしてネオマイシン遺伝子を有する発現ベクター「pCOSI」(Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM.(1994) Mol Immunol. 31, 371-381, Humanization of a mouse anti-human interleukin-6 receptor antibody comparing two methods for selecting human frame

ork regions) のEF 1 α プロモーターの下流にこの遺伝子断片を挿入し、「pCOSI-7F4」を構築した。このプラスミド25 μ gをpvuIで切断した後、KUSA細胞 (7×10^6 cells) にエレクトロポレーション (1.6kv, 25uF, timeconst 0.36) により導入し、G418を480 μ g/mlを含む培地 (IMDM+10%FCS) で数日間培養して、生育したクローンを十数個選抜した。これらクローンの細胞表面を抗血清 (x1000) およびITC標識抗-ウサギIgG (H+L) で染色した後、「flowcytometer ELITE」 (COULTER社製) による分析を行い、親株KUSA細胞と比較して7F4遺伝子の発現量の高いものをいくつか選択した。

【実施例7】 ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリバーゼC処理による細胞表面上の7F4タンパク質の発現の変化の検出

7F4のアミノ酸組成から、疎水性解析ソフト (DNASIS社製) により疎水性を解析すると、シグナル配列をコードする領域であるN末側の他に、C末側にも疎水性に富む領域が存在し、ORFがそこで終結していることが判明した (図5A)。このアミノ酸構造から、この分子は細胞内領域を持たず、グリホシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー (Ikezawa H, Yamanegi M, Taguchi R, Miyashita T, and Ohyabu T (1976) Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim Biophys Acta.* 450, 154-164, Low MG, and Finean, JB (1977) Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem.* 167, 281-284, Low MG, and Saltiel AR (1988) Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* 239, 268-275) により細胞膜に結合しているタンパク質である可能性が推測された。そこで、KUSA細胞、またはKUSA細胞にさらに7F4遺伝子を過剰発現させた細胞株 (「KUSA-7F4#2;低発現させたもの」, 「KUSA-7F4#5;高発現させたもの」) を樹立し、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリバーゼCで処理し、細胞表面上の7F4タンパク質の量的

変化を、抗血清で染色してフローサイトメーター（ELITE）で解析した。細胞は、PBSで洗浄後、「ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリバーゼC」（2U/ml；フナコシ社製）を含む、あるいは含まないバッファー（PBS+1%FCS）で37°Cで1時間インキュベートした。この結果、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリバーゼCで処理すると、いずれの細胞株においても細胞表面上の7F4タンパク質陽性細胞数が減少した（図5B）。このことから、細胞表面の7F4分子はホスファチジルイノシトール特異的ホスホリバーゼCにより切断されうる構造をしていることが判明した。この結果より、7F4遺伝子は細胞表面上にGPIアンカーにより結合して発現している、すなわちGPI型膜タンパク質である可能性が明らかとなつた。

【実施例8】「7F4」タンパク質の過剰発現による細胞の増殖・分化の検出、およびアルカリホスファターゼ活性の変化の検出

(1) 7f4遺伝子発現細胞株の樹立

7F4遺伝子がEF1 α プロモーターの支配下にある発現ベクターpCOSI-7F4、25ugをpvuIで切断した後、KUSA(7X10⁶cells)あるいはCHO細胞にエレクトロポレーション（1.6kV, 25uF, time const 0.36）により導入し、G418を480ug/ml含む培地（IM DM+10%FCSあるいは α -MEM+10%FCS）で数日間培養して、生育したクローンを十数個拾つた。これらクローンの細胞表面を7F4抗血清（x1000）およびFITC標識抗ウサギIgG(H+L)で染色した後、フローサイトメーターELITEによる分析を行い、親株KUSA、あるいはCHOに比べて7F4遺伝子の発現量の高いものをいくつか選択した。これによりpCOSI-7F4が導入され「7F4」タンパク質を弱発現する形質転換体#2、強発現の形質転換体#11を得た。これら形質転換体は培養を続けるうちに細胞の形態が顕著に変化した。親株のKUSAは細長く纖維芽細胞様の形態を示しているが、形質転換体は細胞全体が大きく広がり細かい突起が増えていた。

(2) 増殖解析

12ウェルプレートに5X10³細胞/ウェル（KUSA細胞）、1X10³細胞/ウェル（CHO細胞）でまきこみ培養を行い、その後経時的に細胞をはがして細胞数を数えた。形質転換

体の外来性の7F4の発現レベルは#11が最も高く、ついで#8、#5が中程度、そして#2がもっとも低い。これら細胞の増殖速度は親株に比べて外来性の7F4の発現量に相関して低下していた(図6)。これらの実験結果から、7F4遺伝子の高発現が、KUSAの骨芽細胞としての形質をさらに誘導する、ということが判明した。

(3)アルカリホスファターゼ活性の測定

6ウェルで培養をした細胞をPBSで2回洗浄した後、700ulのソニケーション緩衝液(50mM Tris pH 7.2, 0.1% Triton X-100)で細胞をはがした。軽くこれを超音波破碎し15000rpm、15分遠心した後、蛋白質濃度を「protein assay kit」(bio-rad社製)を用いて測定した。2から20ug相当の細胞溶解物に基質20mM p-ニトロフェノールフォスフェートを含む等量のインキュベーション緩衝液(0.1M 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール/HCl pH 10.5, 2mM MgCl₂)を添加し30分間37°Cでインキュベートした。そして、0.1NになるようにNaOHを加え反応を停止した後、産生されたp-ニトロフェノールの量をOD405で比色定量した。親株KUSA、および形質転換体#2、#11を培養し、細胞が80%程度コンフルエントのとき、すなわち細胞が増殖期のときに細胞より細胞溶解物を調製し、骨芽細胞の分化マーカーの一つである細胞内のアルカリホスファターゼの活性を測定した。その結果、やはり外因性の7F4の発現量に相関してアルカリホスファターゼの活性も上昇していることが明らかとなった(図7)。

同様の実験をCHO細胞で行った。KUSA細胞と同様にCHO細胞にpCOSI-7F4を導入し、外来性の7F4を高発現する細胞株を数種類樹立した(図8)。そして、7F4の高発現によりこれら形質転換体の増殖にどう影響が及ぼされるかを解析した。予想に反してCHO細胞では7F4遺伝子の高発現は細胞の増殖に全く影響を及ぼさなかった(図9)。細胞形態も全く変化しなかった。

産業上の利用可能性

本発明により、TNF受容体スーパーファミリーに属し、骨芽細胞の分化などに

関与していると考えられる新規な膜分泌タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子が挿入されたベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に対する抗体が提供された。また、該タンパク質を利用した医薬品候補化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明のタンパク質、遺伝子、抗体やスクリーニングにより単離された化合物には、医薬品としての応用が考えられる。高齢化社会にともない骨粗鬆症を始めとする骨疾患患者の増加が予想されている。本発明のタンパク質は骨形成過程において重要な骨芽細胞の分化、活性化に関与していると考えられ、本発明のタンパク質、これに対する抗体、またはリガンドなどが骨疾患治療などに貢献すると考えられる。また、骨形成のメカニズムの解明にも貢献すると考えられる。

【配列表】

- (1) 出願人の氏名又は名称：株式会社中外分子医学研究所
 (2) 発明の名称：新規な膜分泌タンパク質
 (3) 整理番号：C 1 - 8 0 6 P C T
 (4) 出願番号：
 (5) 出願日：
 (6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号：
 日本国 平成9年特許願第099653号
 (7) 優先日：1997年4月1日
 (8) 配列の数：12

配列番号：1

配列の長さ：176

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

	Met	Val	Thr	Phe	Ser	His	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	His				
	-28						-25					-20				
	Trp	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Asn	Leu	Phe	Leu	Pro	Val	Ile	Phe	
	-15						-10					-5				
	Ala	Met	Pro	Glu	Ser	Tyr	Ser	Phe	Asn	Cys	Pro	Asp	Gly	Glu	Tyr	Gln
	1			5							10			15		
	Ser	Asn	Asp	Val	Cys	Cys	Lys	Thr	Cys	Pro	Ser	Gly	Thr	Phe	Val	Lys
	20			25								30				
	Ala	Pro	Cys	Lys	Ile	Pro	His	Thr	Gln	Gly	Gln	Cys	Glu	Lys	Cys	His
	35			40								45				

Pro Gly Thr Phe Thr Gly Lys Asp Asn Gly Leu His Asp Cys Glu Leu
 50 55 60
 Cys Ser Thr Cys Asp Lys Asp Gln Asn Met Val Ala Asp Cys Ser Ala
 65 70 75 80
 Thr Ser Asp Arg Lys Cys Glu Cys Gln Ile Gly Leu Tyr Tyr Tyr Asp
 85 90 95
 Pro Lys Phe Pro Glu Ser Cys Arg Pro Cys Thr Lys Cys Pro Gln Gly
 100 105 110
 Ile Pro Val Leu Gln Glu Cys Asn Ser Thr Ala Asn Thr Val Cys Ser
 115 120 125
 Ser Ser Val Ser Asn Pro Arg Asn Trp Leu Phe Leu Leu Met Leu Ile
 130 135 140
 Val Phe Cys Ile
 145

配列番号 : 2

配列の長さ : 148

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Ala Met Pro Glu Ser Tyr Ser Phe Asn Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Gln
 1 5 10 15
 Ser Asn Asp Val Cys Cys Lys Thr Cys Pro Ser Gly Thr Phe Val Lys
 20 25 30
 Ala Pro Cys Lys Ile Pro His Thr Gln Gly Gln Cys Glu Lys Cys His
 35 40 45

Pro Gly Thr Phe Thr Gly Lys Asp Asn Gly Leu His Asp Cys Glu Leu
50 55 60
Cys Ser Thr Cys Asp Lys Asp Gln Asn Met Val Ala Asp Cys Ser Ala
65 70 75 80
Thr Ser Asp Arg Lys Cys Glu Cys Gln Ile Gly Leu Tyr Tyr Tyr Asp
85 90 95
Pro Lys Phe Pro Glu Ser Cys Arg Pro Cys Thr Lys Cys Pro Gln Gly
100 105 110
Ile Pro Val Leu Gln Glu Cys Asn Ser Thr Ala Asn Thr Val Cys Ser
115 120 125
Ser Ser Val Ser Asn Pro Arg Asn Trp Leu Phe Leu Leu Met Leu Ile
130 135 140
Val Phe Cys Ile
145

配列番号 : 3

配列の長さ : 1509

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 12..542

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 12..95

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 96..542

特徴を決定した方法 : S

配列

AGCTCACAGC C ATG GTT ACC TTC AGC CAC GTC TCC AGT CTG AGT CAC	47
Met Val Thr Phe Ser His Val Ser Ser Leu Ser His	
-28 -25 -20	
TGG TTC CTC TTG CTG CTG CTG AAT CTG TTC TTG CCG GTA ATA TTT	95
Trp Phe Leu Leu Leu Leu Leu Asn Leu Phe Leu Pro Val Ile Phe	
-15 -10 -5	
GCT ATG CCT GAA TCA TAC TCC TTC AAC TGT CCC GAT GGT GAA TAC CAG	143
Ala Met Pro Glu Ser Tyr Ser Phe Asn Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Gln	
1 5 10 15	
TCT AAT GAT GTC TGT TGC AAG ACC TGT CCC TCA GGT ACA TTT GTC AAG	191
Ser Asn Asp Val Cys Cys Lys Thr Cys Pro Ser Gly Thr Phe Val Lys	
20 25 30	
GCG CCC TGC AAA ATC CCC CAT ACT CAA GGA CAA TGT GAG AAG TGT CAC	239
Ala Pro Cys Lys Ile Pro His Thr Gln Gly Gln Cys Glu Lys Cys His	
35 40 45	
CCA GGA ACA TTC ACA GGG AAA GAT AAT GGC CTG CAT GAT TGT GAA CTT	287
Pro Gly Thr Phe Thr Gly Lys Asp Asn Gly Leu His Asp Cys Glu Leu	
50 55 60	

GCCCTCCTTG AGAGTAAGTA ACAATTAGA TGAAGGCAAG TCCTGGTATC AGGTCCAAA	1119
GAAACTCAGG ATGAATGGTC CACTGTGGTT CCTATTAACA TACTGAAGAA CATGACCTCA	1179
CCTTAGACTT CTCCACCTCA CTGGCTTCCC TTCCCCTAGC TTCTCATTCC CAGGTAACCC	1239
TGCCATTTTG TGGTAATGTG CCTTCTTGGT TCTTCCTCTC CTTTCCCCCT CTCTTCTGGT	1299
CCTTATTCT CTTCCCTCTCC CACTCTCCAC CAGCCGCCTC TTAAGGCCTG AGTCAGTCTG	1359
CAGGCCATGT TTAATCTACT ACTTTCTCTC TGCTCTGGAC TCATCCAGAT GTCTCTGGCT	1419
GAGCTCTCCC TCCTATCTAC AATAAACCT TCCCCCTAAC CAGAAATGGA ACAGTTTGT	1479
CCTCACTTTG TACATCTGGT GCCTGAAACC	1509

配列番号：4

配列の長さ：43

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GC GGCCGCGA ATTCTGACTA ACTGACGGGG GGGGGGGGGG GGG	43
--	----

配列番号：5

配列の長さ：26

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCCGCGAGCTC GATATCAAGC TTGTAC	26
-------------------------------	----

配列番号：6

配列の長さ : 29

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GGCGCTCGAG CTATAGTCG AACATGGAG

29

配列番号 : 7

配列の長さ : 29

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GAGGTACAAG CTTGATATCG AGCTCGCGG

29

配列番号 : 8

配列の長さ : 23

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCCGCGAATT CTGACTAACT GAC

23

配列番号 : 9

配列の長さ : 24

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGATCCTTCA ACTGTCCCGA TGGT

24

配列番号：10

配列の長さ：26

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAATTCCACA CAGTGTTAGC TGTGGA

26

配列番号：11

配列の長さ：36

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGAATTCCA CCATGGTTAC CTTCAGCCAC GTCTCC

36

配列番号：12

配列の長さ：35

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGGATCCTC AGATAACAGAA GACAATTAGC ATCAG

請求の範囲

1. 配列番号：1または2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、またはこれらタンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を有し、骨細胞の分化誘導活性を有するタンパク質。
2. 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、骨細胞の分化誘導活性を有するタンパク質。
3. 請求項1または2に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 請求項3に記載のDNAが挿入されたベクター。
5. 請求項4に記載のベクターを保持する宿主細胞。
6. 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する抗体。
7. 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) 請求項1または2に記載のタンパク質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。
8. 請求項1または2に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) 細胞表面に発現させた請求項1または2に記載のタンパク質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) 請求項1または2に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を検出する工程、
 - (c) 被検試料非存在下において検出を行った場合と比較して、請求項1または2に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項 7 に記載の方法により単離しうる、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する化合物。
10. 請求項 8 に記載の方法により単離しうる、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の骨細胞の分化誘導活性を促進または阻害する化合物。
11. 天然由来である請求項 9 または 10 に記載の化合物。
12. リガンドである請求項 9 または 10 に記載の化合物。
13. アゴニストである請求項 9 または 10 に記載の化合物。
14. アンタゴニストである請求項 9 または 10 に記載の化合物。

1 / 10

☒ 1

1	AGCTCACAGCC	11
12	ATGGTTACCTTCAGCCACGTCTCCAGTCTGAGTCACTGGTTCCCTTGCTGCTGCTGCTG	71
1	M V T F S H V S S L S H W F L L L L L	20
72	AATCTGTTCTTGCCTGGAATATTGCTATGCCTGAAATCAACTCCTTCACACTGTCCCGAT	131
21	N L F L P V I F A M P E S Y S F N C P D	40
132	GGTGAATAACCAGTCTAATGATGCTGTTGCAAGAACCTGTCCCTCAGGTACATTTGTCAAG	191
41	G E Y Q S N D V C C K T C P S G T F V K	60
192	GCGCCCTGCAAATCCCCATACTCAAGGACAATGTGAGAAGTGTACCCAGGAACATTC	251
61	A P C K I P H T Q G Q C E K C H P G T F	80
252	ACAGGGAAAAGATAATGGCCTGCATGATTGTGAACTTTGCTCCACCTGTGATAAAGACCAAG	311
81	T G K D N G L H D C E L C S T C D K D Q	100
312	AATATGGTGGCTGACTGTTCTGCCACCAAGTGACCGGAAATCGAGTGCCTAAAGGTCTT	371
101	N M V A D C S A T S D R K C E C Q I G L	120
372	TACTACTATGACCCAAAATTCCCGGAATCATGCCGCCATGTACCAAGTGTCCCCAAGGA	431
121	Y Y D P K F P E S C R P C T K C P Q G	140
432	ATCCCTGTCCCTCAGGAATGCAACTCCACAGCTAACACTGTGTGAGTTCATCTGTTCA	491
141	I P V L Q E C N S T A N T V C S S S V S	160
492	AATCCCAGAAACTGGCTGTTCTACTGATGCTAATTGTCTCTGTATCTGA	542
161	N P R N W L F L L M L I V F C I *	177
543	AGAAGATAAAGGTTCTACAGATGGTGTCTGAGCTTCTTTATTGCTGTGAAGAGAA	600
601	ACCATGGAGGCAACTCTTCATTTTATTTTATTGCTCTGAACTTGATTGAG	660
661	ACCAAGGCTGGACTCAAACTCACAGAGATCCGGACTAGGCACCTCTAAATAGGAAAACAT	720
721	TGAATTGGGACTGGCTTACAGTTTCAAGGTTCTGTCCTGATGATTATCATAGTGCAGAAGCA	780
781	TGGAGGCACGGAGGCACACATGGTGTGGAGAAGAGCTGAGAGTTCTGCATCTGATCT	840
841	GCAAGCAATAAAAGGAGACTGTGTGCCACACTACACATAGCTTGAACATAGGAGACCTCA	900
901	AAGCCTGTCCCCACAGTGCACAAACTTCCCTCAACAAGGTCTACCTCTAAATAACCAT	960
961	TTCTTATGAGGCAACATTCAAAACATGAGTCTATGAGGGCCAACCAATTCAAACAC	1020
1021	CACAGGTTAACAAATTGCCCTCTGCAGCTCTGGTGGAGGCCCTCTTGAAGAGTAAGTAA	1080
1081	CAATTAGATGAAGGCAAGTCTGGTATCAGGTCAAAGAAAACCTAGGATGAATGGTCC	1140
1141	ACTGTGGTCTCTTAAACATACTGAAGAACATGACCTCACCTTAGACTTCTCCACCTCAC	1200
1201	TGGCTTCCCTTCCCTAGCTCTCATCCCAGGTAAACCTGCCATTGGTAATGTGC	1260
1261	CTTCTTGGTCTCTCCCTCTCCCTCTGGTCTGGTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	1320
1321	ACTCTCCACCGCCGCTCTTAAAGGCCGTAGTCAGTCTGCAGGGCATGTTTAATCTACTA	1380
1381	CTTCTCTGCTCTGGACTCATCCAGATGTCCTGGCTGAGCTCTCCCTCTATCTACAC	1440
1441	ATAAAACCTCCCTAACAGAAATGGAACAGTTTGTCTCACTTGTACATCTGGTG	1500
1501	CCTGAAACC	1509

2 / 1 0

☒ 2

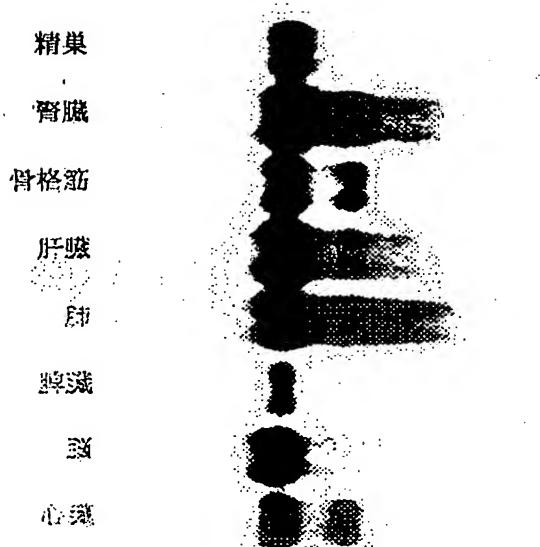
7F4 CPDGEY---QSNDVG CKTCPSGTVKAPCK IPHTQGQCEKCHPGT FTGKDNGLHDCECS 60
mTNFR CPGGKYVHSKNNSIC CTKCHKGTYLVSDCP SPGRDTVCRECEKGT FTASQNYLRQCLSK 60

7F4 TCDKD--QNMVADCS ATSDRKCEC---QIG LYyYDPKFPESCRPC TKCPQGIPVLQECNS 120
mTNFR TCRKEMSQVEISPCQ ADKDTVCGCKENQFQ RYLSETHEQ--CVDC SPCFNGTVTIP-CKE 120

7F4 TANTVC 126
mTNFR TQNTVC 126

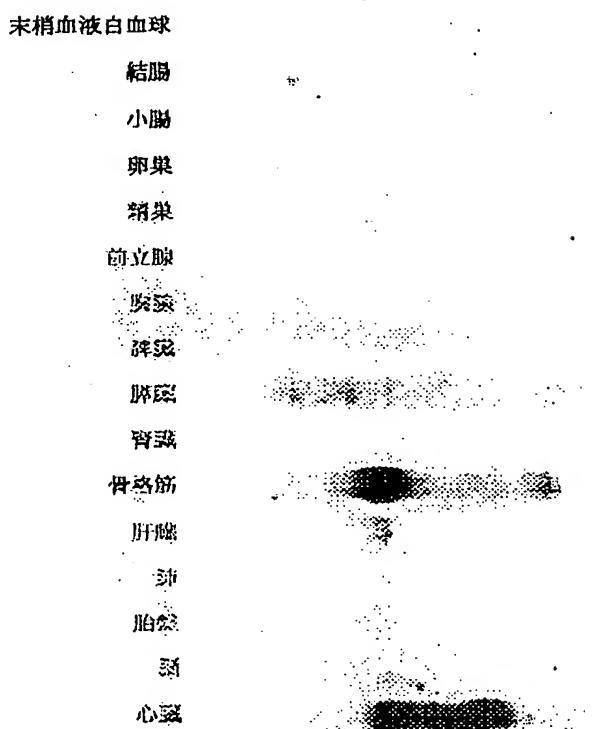
3 / 10

図3



4 / 10

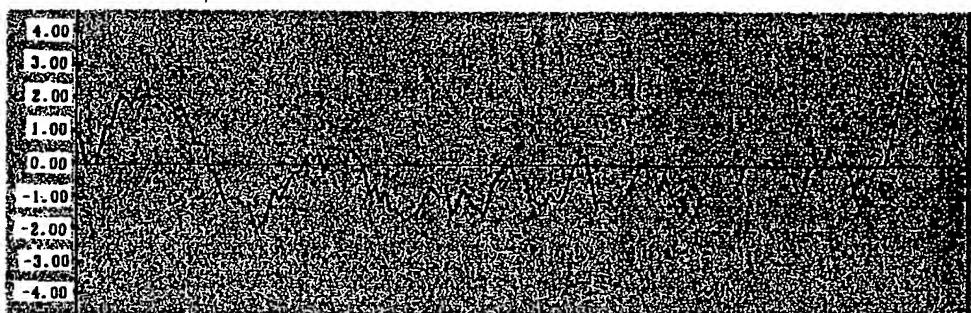
図 4



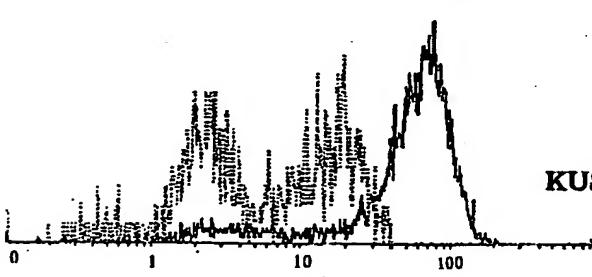
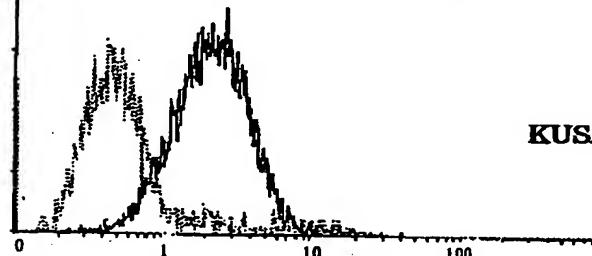
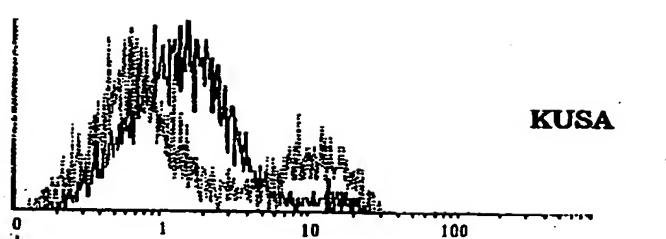
5 / 10

図 5

A.

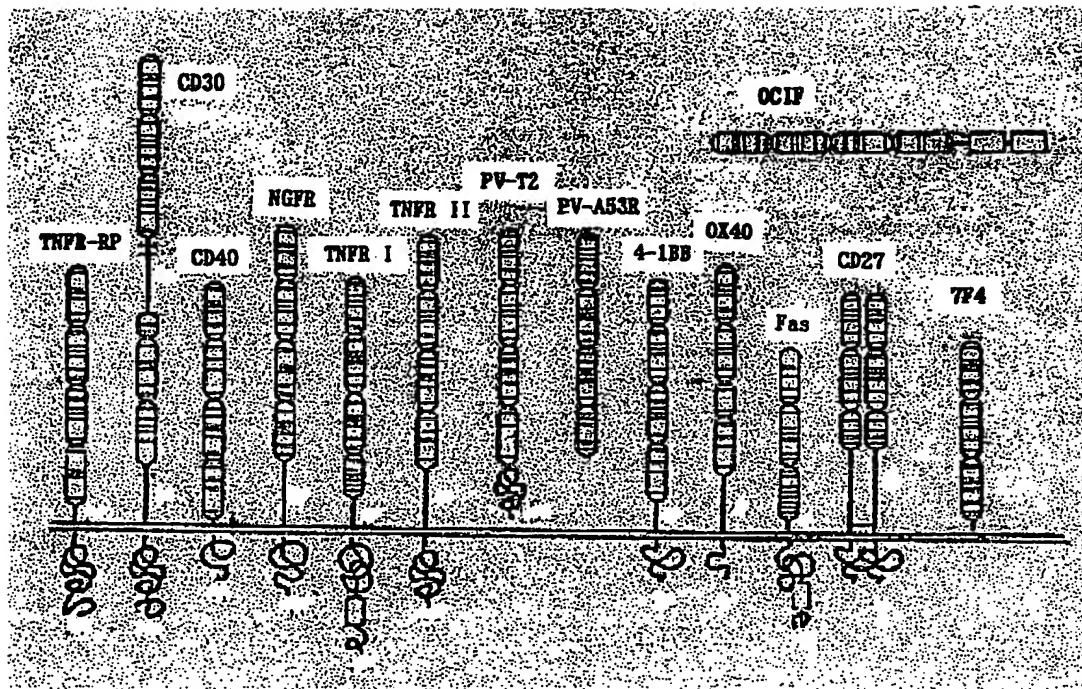


B.



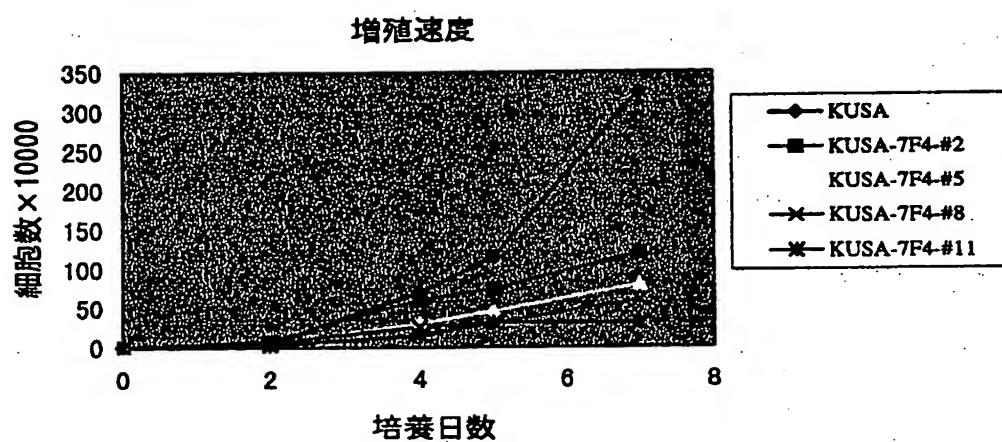
6 / 10

図 6



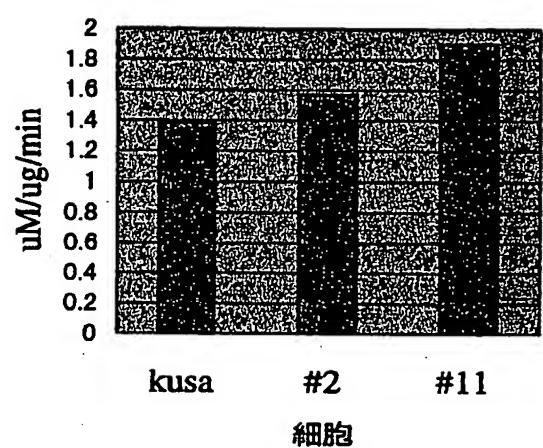
7 / 10

図 7



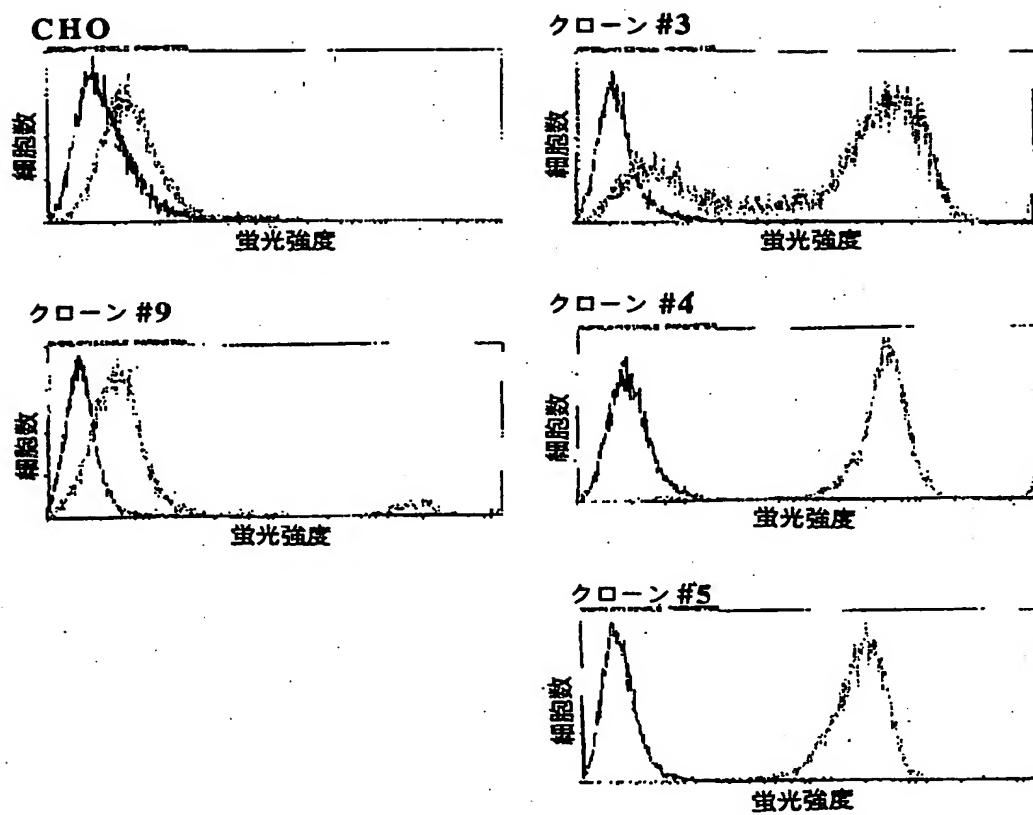
8 / 10

図 8



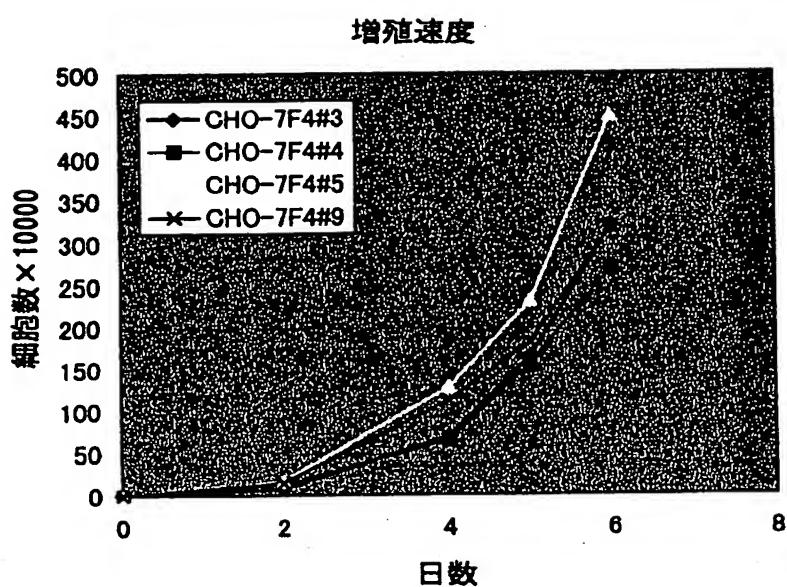
9 / 10

図 9



10 / 10

図 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C07K14/51, C12N15/12, C12N5/10, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C07K14/51, C12N15/12, C12N5/10, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
DDBJ/GenBank/EMBL, GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-118296, A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.), May 9, 1995 (09. 05. 95) (Family: none)	1-14
A	JP, 9-31098, A (Hoechst Japan Ltd.), February 4, 1997 (04. 02. 97) (& WO, 97/04095, A)	1-14
A	JP, 8-510446, A (Creative Biomolecules, Inc.), November 5, 1996 (05. 11. 96) (& WO, 94/20539, A EP, 687272, A)	1-14
A	JP, 9-501305, A (Genetics Institute, Inc.), February 10, 1997 (10. 02. 97) (& WO, 94/26893, A EP, 698095, A)	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
June 18, 1998 (18. 06. 98)

Date of mailing of the international search report
June 30, 1998 (30. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/01511

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl^a C07K 14/51, C12N 15/12, C12N 5/10, C07K 16/18

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl^a C07K 14/51, C12N 15/12, C12N 5/10, C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
DDBJ/GenBank/EMBL, GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-118296, A (住友金属工業株式会社) 9, 5月, 1995 (09. 05. 95) (ファミリーなし)	1-14
A	JP, 9-31098, A (ヘキストジャパン株式会社) 4, 2月, 1997 (04. 02. 97) (& WO, 97/04095, A)	1-14
A	JP, 8-510446, A (クリエイティブ バイオモレキュルズ インコ ーポレイテッド) 5, 11月, 1996 (05. 11. 96) (& WO, 94/20539, A, EP, 687272, A)	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 18.06.98	国際調査報告の発送日 30.06.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 新見 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 4B 9162

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-501305, A (ジェネティクス インスティテュート インコ ー ポレイテッド) 10. 2月. 1997 (10. 02. 97) (& WO, 94/26893, A EP, 698095, A)	1-14